

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 愛美

水田は脱窒が活発であり、畑地に比べて温室効果ガス  $N_2O$  の発生が少ないことが知られている。しかし、水田で活発に脱窒を行っている微生物についてこれまでに得られている知見は少ない。本研究は、水田土壌中で脱窒を担っている微生物の群集構造を培養非依存的な手法によって詳細に解明することを目的とした。この目的を達成するために、脱窒活性を高めた実験室内のモデル水田土壌ならびに水田圃場の土壌より DNA と RNA を抽出し、それらを材料として脱窒機能遺伝子 (*nirS*, *nirK*, *nosZ*) を標的とした PCR ベースの解析を行った。

第一章では、窒素循環、脱窒、水田での脱窒の重要性について述べ、本研究の目的について述べている。

第二章、第三章では、土壌抽出 DNA を用いることで、水田に存在する脱窒菌群集構造解析を行った。まず、第二章では人工的に脱窒活性を高める実験室内モデル水田を用いて、培養前後の土壌から DNA を抽出して脱窒の亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirS*, *nirK*) を標的とした定量的 PCR ならびに PCR-クローンライブラリ解析を行った。土壌中の *nirS* の遺伝子コピー数は培養による変化が見られなかったが、*nirK* の遺伝子コピー数は培養によって増加し、また、*nirS*, *nirK* の組成は培養によって変化し、その変化から *Acidovorax* 属、*Azoarcus* 属、*Kocuria* 属、*Cupriavidus* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Rhodopseudomonas* 属、*Nitrosospira* 属などの *nir* に近縁な *nir* を保有する微生物の他、既知の脱窒菌のものと近縁でない *nir* を保有する微生物がこの土壌で脱窒に関わっていることが示唆された。本章によって脱窒機能遺伝子を標的とした解析が有用であることを検証できた。次に、第三章では水田圃場から定期的に土壌を採取し、第二章と同様に土壌抽出 DNA を用いて *nirS* と *nirK* を標的とした定量的 PCR と PCR-クローンライブラリ解析を行い、土壌の湛水後の時間経過に伴う *nirS*, *nirK* の量と群集構造の変動を調べた。定量的 PCR の結果、水田土壌に含まれる *nirS* のコピー数は、調査期間内に大きな変化を示さなかった。*nirK* は *nirS* の 10 倍程度のコピー数が存在し、調査期間内に変化が見られた。クローンライブラリ解析から、脱窒が活発に行われていると考えられる湛水後の時期に出現する、あるいは存在量が増加する *nirS*, *nirK* 保有微生物群が見出された。それらは、*Aromatoleum* 属、*Azoarcus* 属、*Acidovorax* 属、*Dechloromonas* 属、*Azosprillum* 属の *nirS* に近縁な *nirS* 保有微生物、あるいは既知のものと近縁でない *nir* を保有する微生物であり、これらが水田土壌において脱窒に強く関わっている可能性が示された。

第四章、第五章では、土壌で実際に活動している脱窒菌をより直接的に明らかにするために、土壌 RNA を解析対象とし、脱窒機能遺伝子を発現している微生物の特定を試みた。第四章では、実験室内モデル水田を構築し、培養した土壌から DNA と RNA を抽出し、RNA は逆転写して cDNA

とした。それらを鋳型とし、16S rRNA 遺伝子、*nirS*、*nirK*、*nosZ*、およびその cDNA を標的とした定量的 PCR を行い、遺伝子コピー数ならびに遺伝子の発現量の定量と PCR-クローンライブラリ解析を行った。定量的 PCR の結果、16S rRNA 遺伝子と *nirS*、*nirK* のコピー数は土壤の培養時間の経過に伴って増加した。16S rRNA 遺伝子と *nirS* の遺伝子の発現量も徐々に増加したが、脱窒活性が最大となる培養 20 時間後に最大となった後、減少する傾向を示した。培養 0 時間後ならびに各遺伝子の発現量が最大となった培養 20 時間後の土壤から得た DNA ならびに cDNA からそれぞれクローンライブラリを作成した。その結果、16S rRNA 遺伝子と *nirS*、*nirK*、*nosZ* に共通して *Betaproteobacteria* 綱に属する細菌や、これまでに分離されていない微生物が、脱窒機能を発現している主要な脱窒菌であることが示唆された。第五章では、水田圃場から経時的に採取した土壤に由来する DNA および cDNA の試料から、脱窒活性ポテンシャルが高い湛水 2 週間後および 5 週間後、2 つの時期の DNA 試料と、脱窒活性ポテンシャルが低い湛水前を加えた 3 つの時期の cDNA 試料を選び、*nirS*、*nirK* を標的としたクローンライブラリ解析を行った。湛水期には、*Thiobacillus* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Rhodopseudomonas* 属の *nir* に近縁な *nir* 保有脱窒菌や、既知の微生物の *nir* とは近縁でない *nir* 保有脱窒菌が脱窒に活発に機能していることが示唆された。さらに、これらは、土壤中の脱窒菌の中での存在割合は必ずしも高くないことが示唆された。

第六章では、東大生態調和農学機構および新潟県農業総合研究所の水田土壤から多くの脱窒機能遺伝子配列を用い、本研究が行われた土壤圏科学研究室に蓄積している様々な脱窒菌分離株の 16S rRNA 遺伝子や脱窒機能遺伝子の情報との比較解析を行い、本研究で検出された *nirS*、*nirK*、*nosZ* を保有する脱窒菌を推定することを試みた。その結果、水田で活発に機能している脱窒菌は *Bradyrhizobium* 属や *Pseudogulbenkiania* 属、*Zoogloea* 属、*Duganella* 属であると推定された。

以上、本研究では、水田土壤に存在し機能する脱窒菌群集についての新たな知見が得られた。これらは窒素循環の理解に重大なだけでなく、畑地からの  $N_2O$  発生抑制への応用につながるなど、学術的、応用的に寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。